

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



7.4.94

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 37/02, 9/14, 47/18		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/14466 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Juli 1994 (07.07.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/03544		(81) Bestimmungstaaten: AU, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 15. December 1993 (15.12.93)			
(30) Prioritätsdaten: P 42 42 919.6 18. December 1992 (18.12.92) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder: und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICHAELIS, Uwe [DE/DE]; Puetrichstrasse 25, D-82362 Weilheim (DE). RUDOLPH, Rainer [DE/DE]; Faerbergasse 17, D-82362 Weilheim (DE). WINTER, Gerhard [DE/DE]; Jahnstrasse 20E, D-69221 Dossenheim (DE). WOCG, Heinrich [DE/DE]; Lindenstrasse 6, D-69514 Laudenbach (DE).			
(74) Gemeinsame Vertreter: FOUQUET, Herbert usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).			

(54) Title: AQUEOUS PHARMACEUTICAL PREPARATIONS OF G-CSF WITH A LONG SHELF LIFE

(54) Bezeichnung: LAGERSTABILE WÄSSRIGE PHARMAZEUTISCHE ZUBEREITUNGEN VON G-CSF

(57) Abstract

The invention concerns aqueous pharmaceutical preparations of G-CSF which are stable on storage and which contain at least one buffer selected from the group comprising acetic acid, lactic acid, citric acid, maleic acid, phosphoric acid and their salts or arginine and its salts at a concentration of up to 100 nMol/l.

(57) Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lagerstabile wässrige pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die zur Stabilisierung mindestens einen Puffer ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salze oder Arginin und seiner Salze in einer Konzentration von jeweils bis zu 100 mMol/l enthalten.

Lagerstabile wässrige pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lagerstabile wässrige pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die zur Stabilisierung mindestens einen Puffer ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salze oder Arginin und seiner Salze in einer Konzentration von jeweils bis zu 100 mMol/l enthalten.

Verschiedene pharmazeutische Zubereitungen, die G-CSF (Granulozyten- Kolonie stimmulierender Faktor) enthalten, sind bereits aus dem Stand der Technik bekannt.

In DE 37 23 781 (GB 2,193,631) wird ein G-CSF-haltiges Arzneimittel beschrieben, das zur Stabilisierung von G-CSF mindestens ein pharmazeutisch verträgliches grenzflächenaktives Mittel, Saccharid, Protein oder eine hochmolekulare Verbindung enthält. Es werden dort Zubereitungen vorgeschlagen, die Humanserumalbumin als stabilisierendes Mittel enthalten. Als vorteilhaft werden insbesondere Zubereitungen genannt, die oberflächenaktive Mittel in Gewichtsanteilen enthalten, die dem 1 - 10 000fachen der eingesetzten G-CSF-Menge entsprechen.

In EP 0 373 679 werden stabilisierte Zubereitungen von G-CSF beschrieben, die sich im wesentlichen durch einen sauren pH-Wert der Lösung auszeichnen, wobei die Lösungen eine möglichst geringe Leitfähigkeit aufweisen. Die Lösungen weisen einen pH-Wert von 3 - 3.7 auf, falls die Lösungen weitere pharmazeutische Hilfsstoffe, wie beispielsweise Puffer oder Mannitol enthalten. Für den Fall, daß keine Puffersubstanzen in der Arzneiform vorhanden sind, werden pH-Bereiche von 2,75 - 4 als vorteilhaft beschrieben.

In EP 0 306 824 werden stabilisierte Lyophilisate von Humanprotein-Präparaten beschrieben, bei denen die Stabilisierung durch Zusatz eines Gemisches von Hamstoff, Aminosäuren und Detergents erfolgt.

In der früheren PCT-Patentanmeldung PCT/EP92/01823 wird ein Verfahren zur Herstellung von G-CSF-haltigen, gut verträglichen Arzneimitteln für Infusions- und Injektionszwecke beschrieben. Die flüssigen Darreichungsformen zeichnen sich insbesondere durch eine geringe Titrationsacidität und geringe Pufferkapazität aus. Die pH-Werte der beschriebenen G-CSF-haltigen Infusions- und Injektionslösungen liegen im sauren Bereich von 3,8 - 4,5.

Verfahren zur Herstellung von G-CSF-haltigen flüssigen Arzneiformen, die zusätzlich Konservierungsmittel enthalten, sind bekannt aus PCT/EP92/01822. Die pH-Werte der pharmazeutischen Lösungen liegen im sauren Bereich von 2,5 - 4,5. Die Stabilisierung von G-CSF wird dort im wesentlichen durch die Einstellung des für G-CSF günstigen sauren pH-Wertes und durch Zugabe einer Mischung von verschiedenen Aminosäuren erreicht.

Die bisher bekannten Arzneiformen für G-CSF besitzen jedoch einige Nachteile. Die in DE 37 23 781 beschriebenen Zubereitungen enthalten pharmazeutische Zusatz- oder Hilfsstoffe, die aus medizinischer Sicht nicht ohne weiteres als unbedenklich einzustufen sind. Polymere und Proteine besitzen im Hinblick auf ihre Eignung als pharmazeutische Zusatzstoffe aufgrund ihrer Herkunft und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ein gewisses Risikopotential. Proteine menschlichen oder tierischen Ursprungs sowie aus Zellkulturen gewonnene Proteine tragen ein potentielles Restrisiko viraler Verunreinigungen. Auch andere, analytisch schwer nachweisbare proteinartige Verunreinigungen können wegen ihrer antigenen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen hervorrufen. Proteine tierischen Ursprungs können darüber hinaus generell aufgrund ihrer species-spezifischen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen auslösen. Auch Langzeitreaktionen nach späterer Reapplikation derartiger Proteine sind möglich.

Der Zusatz von hochmolekularen Verbindungen kann ebenfalls problematisch sein. Polymere sind aufgrund ihrer großen Molekülmasse im Körper akkumulierbar und können somit, falls kein Bioabbau erfolgt, über lange Zeit im Körper verbleiben. Dies ist besonders bei subkutaner Applikation zu befürchten, da der Abtransport und die Verteilung durch den Blutstrom gegenüber intravenöser Gabe stark verlangsamt erfolgt. In Abhängigkeit von der Molmasse können Polymere auch antigene Eigenschaften aufweisen. Auch ist die Reinheit von Polymeren aufgrund der zur Herstellung verwendeten Katalysatoren oder des Vorhandenseins von Monomeren

und anderen Polymer-Bruchstücken schwierig zu gewährleisten. Der Einsatz von Polymeren bei flüssigen pharmazeutischen Darreichungsformen, insbesondere bei subkutan applizierbaren Arzneiformen ist somit, wenn möglich, zu vermeiden.

Die in DE 37 23 781 beschriebenen Tensidmengen sind aus medizinischer Sicht ebenfalls als problematisch anzusehen. Dort werden Tensidkonzentrationen als vorteilhaft beschrieben, die bezüglich der Gewichtsanteile von G-CSF 110000 Gewichtsanteile eines oberflächenaktiven Mittels enthalten. Betrachtet man andererseits die für den klinischen Gebrauch bevorzugten Anwendungskonzentrationen von G-CSF von 0,05 - 1,5mg/ml in den fertigen Arzneiformen, so ergeben sich entsprechend hohe Tensidkonzentrationen. Diese sind aus medizinischer Sicht zu vermeiden, da sie lokale Irritationen auslösen können.

Die oben beschriebenen Formulierungen haben den Nachteil, daß sie aufgrund des angewandten niedrigen pH Wertes insbesondere bei subkutaner Anwendung zu lokalen Unverträglichkeiten beim Patienten führen. Das erhaltene Produkt kann bei empfindlichen Patienten zu Schmerzen und lokaler Gewebereizung führen, da der im Gewebe physiologisch vorliegende Bereich von pH 7,0 - 7,5 nicht eingehalten wird.

Aus der Literatur ist ferner bekannt, daß insbesondere nicht glykosilierte Formen von G-CSF gegenüber glykosiliertem GCSF, das aus CHO-Zellen gewonnen wird, besonders instabil sind (J. Biol. Chem. 1990, 265, 11432). Die Stabilisierung von nicht glykosilierten Formen von G-CSF ist deshalb besonders schwierig und bedarf speziell ausgewählter Maßnahmen, um dieses Molekül in einer stabilen Arzneiform zu formulieren.

Als wesentlicher Nachteil von flüssigen G-CSF-haltigen Arzneiformen wurde darüberhinaus jedoch festgestellt, daß sie vor allem bei längerer Lagerung oder im Verlauf des Transportes auf den Vertriebswegen relativ leicht zur Bildung von Trübungen neigen. Insbesondere hat sich gezeigt, daß die applizierbaren Lösungen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mechanischem Stress aufweisen. Mechanische Belastungen, wie beispielsweise Schütteln der Lösung, kann während des Transportes der flüssigen Arzneiformen in vielfältiger und unkontrollierbarer Weise auf sie einwirken. Auch bei der Anwendung durch den Arzt, medizinisches Personal oder den Patienten können falsche Handhabung und damit möglicherweise mechanische Belastungen der in Ampullen oder Vials abgefüllten pharmazeutischen Lö-

sung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Dementsprechend ist die Robustheit gegenüber mechanischem Stress ein Qualitätskriterium für Proteinärzneimittel. Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der Stabilität von G-CSF gegenüber mechanischer Belastung wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Nach üblichen Verfahren hergestellte flüssige Zubereitungen von G-CSF weisen zwar eine ausreichende Stabilität selbst bei Lagerung unter erhöhten Temperaturen auf, jedoch ist die Stabilität derartiger Rezepturen gegenüber mechanischer Belastung nicht in allen Fällen befriedigend. Insbesondere treten häufig sichtbare Trübungen der Arzneilösungen auf, die durch die Bildung von Dimeren oder Aggregaten von G-CSF hervorgerufen werden. Derartige Veränderungen der flüssigen Arzneiformen wirken sich vor allem negativ auf die Menge des in der einzelnen Darreichungsform enthaltenen aktiven Wirkstoffes aus und sind aus medizinischer Sicht möglichst zu vermeiden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine stabile flüssige Arzneiform für G-CSF zur Verfügung zu stellen, die eine ordnungsgemäße Anwendung von G-CSF als Arzneimittel ermöglicht, und die oben beschriebenen Nachteile der bisher bekannten Arzneiformen nicht aufweist. Die pharmazeutische Zubereitung sollte insbesondere langfristig lagerstabil, stabil gegenüber mechanischer Belastung, physiologisch gut verträglich, einfach handhabbar und exakt dosierbar sein. Sie sollte insbesondere einen physiologisch verträglichen pH-Wert aufweisen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß man im Sinne der vorliegenden Erfindung stabile wässrige pharmazeutische Arzneiformen herstellen kann, wenn man als Zusatzstoffe eine Puffersubstanz ausgewählt aus der Gruppe Acetat, Lactat, Citrat, Maleat oder Phosphat einsetzt. Diese werden vorteilhaft in einer solchen Menge eingesetzt, daß die Konzentration der jeweils ausgewählten Puffersubstanz in der fertigen applizierbaren Arzneiform, die in den Handel kommt, von 2 bis zu 100 mMol/l beträgt. Die so hergestellten Lösungen sind überraschenderweise weitgehend stabil gegenüber mechanischer Belastung. Sie haben außerdem den Vorteil, daß durch die getroffene Auswahl der Puffersubstanzen Lösungen zur Verfügung gestellt werden können, die einen vorteilhaften pH-Wert von 4 - 5 oder 7 - 8 aufweisen, während die aus dem Stand der Technik bekannten Lösungen aus Stabilitätsgründen des Proteins vorzugsweise Lösungen mit einem pH-Wert von 2,5 - 3,5 erforderlich machten.

Die erfindungsgemäß hergestellten Zubereitungen besitzen außerdem den Vorteil, daß sie frei von proteinartigen oder polymeren Hilfsstoffen sind, deren Verwendung aus medizinischer Sicht problematisch sein kann. Aufgrund der Tatsache, daß nun mehr flüssige G-CSF-haltige Arzneiformen mit einem pH- Wert von 7 - 8, d.h. mit einem pH-Wert in der Nähe des pH-Wertes des Blutes (pH 7,2 - 7,4), hergestellt werden können, besitzen sie ferner den Vorteil, gut verträglich und weitgehend schmerzfrei applizierbar zu sein.

Vorteilhaft ist ferner, daß aufgrund der getroffenen Auswahl der Hilfsstoffe die bisher benötigten relativ hohen Tensidmengen in den flüssigen Arzneiformen nicht mehr erforderlich sind. Vielmehr sind niedrige Tensidmengen von 0,5 mg/ml oder weniger, vorzugsweise von 0,01 - 0,1 mg/ml, ausreichend zur Stabilisierung von G-CSF. Vorteilhaft können Tensidkonzentrationen (mg/ml) verwendet werden, die kleiner als oder maximal gleich der eingesetzten Proteinmenge an G-CSF pro Volumeneinheit (mg/ml) sind. Dies ist vor allem bei solchen flüssigen Arzneiformen von Vorteil, die für die subkutane Anwendung von G-CSF bestimmt sind. Außerdem werden durch die erfindungsgemäßen Maßnahmen insbesondere die labilen, unglykosilierten G-CSF-Moleküle für pharmazeutische Zubereitungen ausreichend stabilisiert. Durch die gezielt getroffene Auswahl der Hilfsstoffe werden insgesamt sehr gut verträgliche G-CSF-haltige Arzneiformen zur Verfügung gestellt, die bezüglich der Proteinstabilität qualitativ hochwertige Zubereitungen darstellen.

Die erfindungsgemäßen G-CSF-haltigen Arzneiformen enthalten den Wirkstoff in einer zur Erzielung eines therapeutischen Effektes ausreichenden Menge. In der Regel werden Wirkstoffkonzentrationen von 0,01 - 5 mg/ml verwendet, vorzugsweise 0,1 - 1,5 mg/ml.

Erfindungsgemäß werden als pharmazeutische Hilfsstoffe und Puffersubstanzen Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure und Phosphorsäure oder deren physiologisch verträglichen Salze eingesetzt. Bei der Herstellung der Hilfsstofflösung können diese Puffersubstanzen entweder in Form der entsprechenden freien Säure oder in Form der Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze vorgegeben werden. Außerdem kann die Lösung weitere pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe enthalten. Die Reihenfolge der Zugabe der verschiedenen Hilfsstoffe oder des Wirkstoffes bei der Herstellung der flüssigen Arzneiformen ist weitgehend unabhängig hinsichtlich der erfindungsgemäß gefundenen lagerstabilisierenden Wirkung und liegt im Ermessen des Fachmannes. Der gewünschte pH-Wert der Lösung wird durch Zu-

gabe von Basen, wie beispielsweise von Alkalihydroxiden, Erdalkalihydroxiden oder Ammoniumhydroxid eingestellt. Vorzugsweise wird hierzu Natriumhydroxid verwendet. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes ist prinzipiell durch Zugabe von basischen Lösungen möglich. In diesem Sinne kommen allgemein Salze von starken Basen mit schwachen Säuren in Frage, wie z. B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Di-Natrium- bzw. Di-Kalium-hydrogenphosphat oder Natriumcarbonat. Für den Fall, daß die pharmazeutische Hilfsstofflösung einen basischen pH-Wert aufweist, erfolgt die Einstellung durch Titration mit Säure, bis der gewünschte pH-Bereich von 4 - 5 oder 7 - 8 erreicht ist. Als Säuren kommen physiologisch verträgliche anorganische oder organische Säuren in Frage, wie beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Zitronensäure oder allgemein übliche Lösungen von Substanzen, die einen sauren pH-Wert besitzen. Bevorzugte Substanzen sind in diesem Sinne Salze von starken Säuren mit schwachen Basen, wie z.B. Natriumdihydrogenphosphat oder Kaliumdihydrogenphosphat.

Auch Arginin und seine Salze werden erfindungsgemäß als pharmazeutische Hilfsstoffe und Puffersubstanzen eingesetzt.

Die Konzentrationen der Puffersubstanzen Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure oder Phosphorsäure in der fertig applizierbaren flüssigen Arzneiform betragen jeweils etwa 2 - 100 mMol/l. Aufgrund der Tatsache, daß die vorgenannten Säuren bei der Herstellung der pharmazeutischen Hilfsstofflösung häufig in Form ihrer Salze eingesetzt werden, und seltener in Form der freien Säure, wird im folgenden der Einfachheit halber jeweils Bezug genommen auf die Anionen-Konzentrationen dieser Säuren, also beispielsweise Acetat, Citrat, Lactat, Maleat oder Phosphat. Die Gesamtkonzentrationen an Puffersubstanzen sollte einen Wert von 100 mMol/l, vorzugsweise 80 mMol/l, nicht übersteigen. Bevorzugt beträgt die Gesamtkonzentration der Puffersubstanzen etwa 5 - 40 mMol/l.

Es hat sich gezeigt, daß bestimmte pH-Bereiche der flüssigen Arzneiform in Kombination mit bestimmten Puffersubstanzen besonders stabile Lösungen ergeben. Bei Verwendung eines Acetat- oder Lactatpuffers in einer Konzentration von 5 - 40 mMol/l und Einstellung des pH-Wertes der Lösung auf einen Bereich von etwa 2 - 5 wird eine gegenüber mechanischer Belastung besonders stabile Arzneiform erreicht. Bevorzugt werden folgende Pufferkonzentrationen und pH-Werte verwendet: 5 - 80 mMol/l, insbesondere 10 - 30 mMol/l, Acetat oder Lactat und pH 3,5 - 5.

Citrat wird in einer Konzentration von 5 - 40 mMol/l, vorzugsweise 5 - 20 mMol/l, eingesetzt. Bevorzugt wird eine Kombination der Puffersubstanzen Citrat und Phosphat verwendet, wobei die Gesamtkonzentration der Puffersubstanzen 10 - 40 mMol/l, vorzugsweise 15 - 30 mMol/l beträgt. Die pH-Werte der flüssigen Arzneiform liegen hierbei vorteilhafterweise im Bereich von etwa 2,5 - 3,5 oder 7 - 7,5.

Maleat wird vorzugsweise in einer Konzentration von 5 - 40 mMol/l eingesetzt. Die pH-Werte der flüssigen Arzneiform liegen hierbei vorteilhafterweise im Bereich von etwa 2,5 - 3,5 oder 7 - 7,5.

Phosphat wird in einer Konzentration von 5 - 80 mMol/l, vorzugsweise von 5 - 30 mMol/l, allein oder in Kombination mit einer der anderen Puffersubstanzen verwendet. Die pH-Werte der flüssigen Arzneiform, die allein Phosphatpuffer enthält, liegen vorteilhafterweise im Bereich von etwa 3,5 - 5 oder 7 - 8.

Argininphosphat, Argininchlorid- und Argininatratpuffer wird ebenfalls in einer Konzentration von 2 - 100 mMol/l, vorzugsweise 5 - 80 mMol/l, eingesetzt. Der pH-Wert der flüssigen Zubereitung, die Argininpuffer enthält, liegt bei etwa 7 - 8, vorzugsweise bei 7 - 7,5.

Die erfindungsgemäß beschriebene Auswahl von Puffersystemen bei physiologisch verträglichen pH-Werten und in physiologisch verträglichen Konzentrationen ist auch bei aus Lyophilisaten oder Pulvern durch Wiederauflösen hergestellten Lösungen von G-CSF sinnvoll und vorteilhaft.

Da beim Wiederauflösen von Lyophilisaten mechanische Agitation ausgeübt wird (Schütteln), ist hierbei die gezielte Auswahl bestimmter Puffersysteme und pH-Werte wichtig. Die Auswahl nicht erfindungsgemäßer Puffersysteme oder pH-Werte kann zur Ausbildung von Aggregationen, Trübungen und somit zu einem qualitativ minderwertigen Produkt führen.

Es bleibt dabei dem Fachmann überlassen, ob die zur Herstellung der erfindungsgemäßen pH-Werte und Puffersysteme notwendigen Säuren, Salze, Basen im Lyophilisat oder in der zur Auflösung benutzten wässrigen Lösung oder in beiden Komponenten enthalten sind.

Aus den erfindungsgemäßen wässrigen Zubereitungen lassen sich durch übliche Lyophilisation Lyophilisate oder z. B. durch Sprühtrocknung Pulver herstellen. Durch Auflösung dieser in Wasser oder wässrigen Lösungen werden wiederum die erfindungsgemäßen Zubereitungen erhalten. Es hat sich gezeigt, daß wiederaufgelöste Lyophilisate, die Argininpuffer im pH-Bereich von 7 - 7,5 enthalten, mindestens 24 Stunden haltbar sind.

Die mittels der genannten Puffersubstanzen mögliche Stabilisierung von G-CSF-Molekülen bezieht sich prinzipiell auf alle durch rekombinante Verfahren hergestellte G-CSF-Moleküle und deren Varianten. Der Begriff G-CSF oder G-CSF-Variante gemäß vorliegender Erfindung beinhaltet alle natürlich vorkommenden Varianten von G-CSF, sowie davon abgeleitete durch rekombinante DNA-Technologie modifizierte G-CSF-Proteine, insbesondere Fusionsproteine, die neben dem G-CSF-Anteil noch andere Proteinsequenzen enthalten. Besonders bevorzugt ist in diesem Sinne ein G-CSF-Mutein mit einem N-terminalen Met-Rest an Position - 1, das zur Expression in prokaryontischen Zellen geeignet ist. Ebenso geeignet ist eine rekombinante methioninfreie G-CSF-Variante, die gemäß PCT/EP91/00192 hergestellt werden kann. Unter dem Begriff "GCSF-Variante" werden solche G-CSF-Moleküle verstanden, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt sein können, wobei die wesentlichen Eigenschaften von G-CSF weitgehend erhalten bleiben. Geeignete G-CSF-Muteine sind beispielsweise in EP 0 456 200 beschrieben.

Zur Prüfung der Stabilität der flüssigen Arzneiformen gegenüber mechanischer Belastung eignet sich insbesondere die Messung der Trübung von G-CSF-haltigen Lösungen. Die Bewertung der Trübung einer Proteinlösung nach Einwirkung von mechanischem Stress ist als einfach auszuführende Prüfmethode besonders wertvoll. Das Auftreten von Trübungen korreliert mit dem Entstehen von Polymeren, Oligomeren und Aggregaten. Die optische Begutachtung erweist sich in einigen Fällen den spezielleren Methoden zur Detektion von Dimeren und Aggregaten (z.B. HPLC-Methoden) überlegen, da große Aggregate bei der Trübungsmethode nicht durch die Probenvorbereitung, wie beispielsweise im Falle der HPLC erforderlich, der Quantifizierung entzogen werden, sondern im Originalgefäß begutachtet und so mit Sicherheit erkannt werden können. Die Quantifizierung von Trübungerscheinungen ist mit handelsüblichen Turbidimetern, Streulichtphotometern, etc. leicht möglich. Die Bewertung derartiger Ergebnisse läßt sich auch in die Anforderungen

der Arzneibücher übertragen, die z.B. Trübungseckwerte definieren, unterhalb derer Lösungen als klar bzw. leicht getrübt angesehen werden können.

Zur Herstellung gut verträglicher parenteraler Arzneiformen ist der Zusatz von isotonisierenden Hilfsstoffen zweckmäßig, wenn nicht durch die osmotischen Eigenschaften des Wirkstoffes und der zur Stabilisierung eingesetzten Hilfsstoffe bereits Isotonie erreicht werden kann. Dazu werden vor allem nicht-ionisierte, gut verträgliche Hilfsstoffe, wie z. B. Mannit, Glycerol oder andere Zuckeralkohole eingesetzt.

Im Falle von G-CSF wird vorzugsweise Mannit eingesetzt, ohne daß dieses für die Stabilität von G-CSF wesentlich ist. Die Stabilität des Proteins ist in gleicher Weise auch in Mannit-freien Zubereitungen gegeben, jedoch sind die Lösungen dann aufgrund ihrer mangelnden Isotonie weniger gut verträglich.

Der Zusatz von Salzen ist zur Einstellung der Isotonie nicht vorteilhaft, da hohe Salz- oder Ionenkonzentrationen die Aggregatbildung von G-CSF fördern. Vorteilhaft werden deshalb Salze in geringer Menge zugesetzt. Die Pufferkonzentrationen sind so bemessen, daß der pH-stabilisierende Effekt zwar erreicht, die Ionenstärke jedoch so gering als möglich gehalten wird. Die Pufferkonzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von bis zu 80mMol/l, besonders bevorzugt weniger als 30 mMol/l.

Außerdem können die fertig applizierbaren Injektionslösungen weitere übliche Hilfs- oder Zusatzstoffe enthalten. Es können Antioxidantien, wie beispielsweise Glutathion, Ascorbinsäure oder ähnliche Substanzen, chaotrope Hilfsstoffe, wie beispielsweise Harnstoff, und Aminosäuren, wie beispielsweise Arginin, Lysin, Ornithin, u.a. zugesetzt werden.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von repräsentativen Ausführungsbeispielen näher beschrieben:

Beispiel 1:**Allgemeines Verfahren zur Herstellung der flüssigen Arzneiformen**

Die in den Beispielen verwendeten Lösungen von G-CSF wurden hergestellt, indem die beschriebenen Hilfsstoffe in Wasser für Injektionszwecke gelöst wurden, GCSF in der angegebenen Menge zugesetzt wurde und, falls notwendig, der pH-Wert mit einer kleinen Menge Pufferkomponente genau auf den Sollwert eingestellt wurde. Die Lösungen wurden dann durch geeignete sterilisierte Membranfilter von 0,2 μm Porenweite filtriert und in Injektionsfläschlein aus Glas der hydrolytischen Klasse I abgefüllt und mit sterilen, teflonisierten Gummistopfen verschlossen. Die Abfüllung erfolgte vorzugsweise unter Stickstoffbegasung.

Beispiel 2:**Untersuchungsmethoden zur Stabilitätsbestimmung**

Die verschlossenen und verbördelten Flaschen wurden unter Lichtausschluß bei definierten Lagertemperaturen gelagert und danach mit reversed phase HPLC (RP-HPLC), Gelchromatographie oder size exclusion Chromatographie (SEC HPLC) und Western Blot auf Proteinreinheit sowie das Auftreten von Aggregaten und Dimeren hin untersucht. Die angewandten Methoden lassen sich wie folgt beschreiben:

2.1 Reversed phase HPLC

Die RP-HPLC erfolgte unter Verwendung einer Nucleosil C18-Säule (Fa. Knauer). Die mobile Phase bestand aus 0,12 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)/Wasser (A) und 0,1 % (v/v) TFA/Acetonitril (B). Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min unter Verwendung eines linearen Gradienten von A nach B durchgeführt.

Die Injektionsmenge betrug je nach Rezeptur 3 - 6 μg G-CSF. Die Auswertung erfolgte über die Peakfläche unter Verwendung eines externen Standards bei einer Wellenlänge von 214nm.

2.2 Size Exclusion Chromatographie (SEC)

Für die SE-Chromatographie wurde eine TSK G 2000 SW-Trennsäule (7,5 x 300 mm) verwendet. Die Trennungen erfolgten isokratisch bei Raumtemperatur und einer Flußrate von 0,6ml/min in einem Phosphatpuffer (22,2 mM Na₂HP04; 107,7mM KH₂PO₄; pH 6,2). Die Injektionsmenge betrug 3 - 6 µg G-CSF. Die Auswertung erfolgte über die Peakfläche unter Verwendung eines externen Standards bei einer Detektionswellenlänge von 214nm.

2.3 SDS-Page/Western Blot

3 µg rhG-CSF werden unter nichtreduzierenden Bedingungen auf ein 12prozentiges Polyacrylamid-SDS-Gel gegeben und der Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend werden die nach ihrem Molekulargewicht getrennten G-CSF-Monomere, -Dimere oder -Aggregate durch Elektroblotting auf Nitrocellulose transferiert. Durch Inkubation mit einem spezifischen polyklonalen biotinylierten Anti-G-CSF-Antikörper (PAK < GCSF >IgG) werden die Proteinbanden identifiziert und mittels der Phosphatase-Technik unter Benutzung von Streptavidin-alkalischem Phosphatasekonjugat (SA-AP-Konjugat), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitro Blue Tetrazolin (NBT) nachgewiesen.

Die Bestimmung der prozentualen Monomeren-, Dimeren- bzw. Aggregatanteile erfolgt durch laserdensitometrische Auswertung mit Hilfe einer rhG-CSF-Standardreihe.

2.4 NFS-60 Bioassay (biologische Wirksamkeit)

Die *in vitro* Aktivitätsbestimmung von G-CSF basiert auf der Messung von Zellzahlen in einer durch G-CSF stimulierten Zellkultur von NFS-60 Zellen.

Unter geeigneten Bedingungen kann die Dehydrogenase-Aktivität der Zellen mit der Konzentration an G-CSF im Medium korreliert werden. Es werden geeignete Verdünnungen der G-CSF Pufferlösung hergestellt, um einen einfach meßbaren Anstieg in der Dehydrogenase-Aktivität zu erhalten.

Die Messung der Aktivität erfolgt dann photometrisch bei 570 und 690 nm, gemessen wird die Reduktion des Tetrazolinium-Salzes MTT (gelb) zu Formazan (blau).

Die *in vitro* Aktivität von G-CSF wird berechnet, indem die Daten der Probe gegen Standard nach der Methode der parallelen Linie verglichen werden. Die Auswertung erfolgt gemäß den Anforderungen der Ph. Eur. (VIII, 13).

2.5 Photometrie OD 280 (Proteingehalt)

Das G-CSF-UV-Spektrum hat ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, das auf Seitenkettenchromophore wie Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalaninreste zurückzuführen ist. Die Messung erfolgt im Vergleich zu Placebo-Lösungen mittels:

- UV-Spectrophotometer
(z. B. Uvikon 810 P oder 941, Kontron Instruments)
- Semi-micro Quartz Küvetten, 500 µl, Schichtdicke: 1 cm
(z. B. Hellma, Suprasil, Cat. No. 104.002B-QS)

2.6. Streulichtmessung, Trübunasmessung

Die Messung erfolgt direkt an der unverdünnten Produktlösung in Glasküvetten (Durchmesser 2 cm). Das von der Flüssigkeit diffus abgelenkte Streulicht wird unter einem Winkel von 90° gemessen. Gemessen wird im Vergleich zu Formazin-Standard-Suspensionen nach DIN 38404C2, die Angabe der Werte erfolgt in TE/F. Die Messung erfolgt an einem geeigneten Trübungsphotometer, z. B. LTP 5 (Fa. Dr. Lange, Düsseldorf).

Beispiel 3:**Untersuchungen zur mechanischen Belastbarkeit (Turbidität)**

G-CSF-Lösungen bei einer Konzentration von 0,5 mg/1ml wurden durch Dialyse mit den nachfolgend genannten Puffern hergestellt. Zur Ermittlung der nach mechanischen Stress auftretenden Trübungen wurden Proben von jeweils 1 ml in Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse 1 abgefüllt und mit Stopfen verschlossen. Die Proben wurden 10 Sek. bei maximaler Intensität auf Laborschüttlem (z.B. Firma Heidolph) behandelt. Direkt nach dem mechanischen Stressvorgang folgte die Streulichtmessung mit einem Hitachi F4000-Fluoreszenzspektrophotometer bei einer EX- und EM-Wellenlänge von jeweils 360 nm. Angegeben werden nachfolgend die Streulichtintensitäten bei 360nm in Abhängigkeit vom pH-Wert und der eingesetzten Puffer. Die angegebenen Molaritäten des Acetat- und Citratpuffers beziehen sich auf die vorgelegten Molaritäten Essigsäure und Zitronensäure. Die entsprechenden pH-Werte wurden mit Natronlauge eingestellt. Phosphat-/Citratpuffer wurde durch Vorlegen der entsprechenden Menge Zitronensäure und pH-Einstellung mit Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt. Phosphatpuffer wurden durch Vorlage der gegebenen Molaritäten an Natriumdihydrogenphosphat und Einstellen der pH-Werte mit Phosphorsäure bzw. Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt.

Beispiel 4:

Wie in Beispiel 1 angegeben wird eine flüssige Arzneiform von G-CSF hergestellt und der pH-Wert der Lösung auf 4,5 eingestellt. Die Zubereitungen enthalten im einzelnen die in der Tabelle 1 angegebenen Bestandteile:

Tabelle 1: G-CSF-Lösungen mit pH 4,5

	Rezeptur 1	Rezeptur 2
G-CSF	0,25 mg	0,25 mg
Mannit	25 mg	25 mg
Polysorbat 80	0,02 mg	0,02 mg
Puffer	Citrat/Phosphat	Phosphat
	5 mMol/l	5 mMol/l
Wasser	ad 0,5 ml	ad 0,5 ml
pH	4,5	4,5

	Rezeptur 3	Rezeptur 4
G-CSF	0,25 mg	0,25 mg
Mannit	-	25 mg
Polysorbat 80	0,02 mg	0,02 mg
Puffer	Phosphat	Acetat
	5 mMol/l	10 mMol/l
Wasser	ad 0,5 ml	ad 0,5 ml
pH	4,5	4,5

a) Ergebnisse bezüglich Proteinreinheit bei ruhiger Lagerung

Die Analysen der flüssigen Rezepturen 1 - 4 durch RP HPLC, SEC HPLC und Western Blot zeigen, daß die Reinheit des unveränderten Proteins > 99 % beträgt und keine Dimere oder Aggregate von G-CSF nachweisbar sind. Diese Ergebnisse wurden erhalten nach Lagerung der Rezepturen 1 - 4 über sechs Monate bei 4 - 8 °C, nach Lagerung über vier Wochen bei + 30 °C und nach Lagerung über vier Wochen bei + 40 °C. Die Ergebnisse zeigen, daß Lösungen von G-CSF bei einem pH von 4,5 und unterschiedlichen Lagerbedingungen hinsichtlich ruhiger Lagerbedingungen als weitgehend stabil gekennzeichnet werden können.

b) Ergebnisse bezüglich Proteinreinheit nach mechanischer Belastung

Die Auswahl eines Puffers und des geeigneten pH-Wertes der Lösung für die chemisch-physikalische Stabilität bei ruhiger Lagerung ist jedoch unterschiedlich im Hinblick auf die Stabilität nach mechanischer Belastung. Bei pH 4,5 ist diese Stabilität in Acetat- und Phosphatpuffern gegeben, nicht aber in einer Puffermischung von Citrat/Phosphat. Die erhaltenen Ergebnisse sind im einzelnen der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 2:

	Trübung nach 6 Monaten bei 4 - 8 °C	Trübung nach mechanischem Streß direkt nach Herstellung	bei 4 - 8 °C	bei 40 °C
Rez. 1	keine	stark	stark	stark
Rez. 2	keine	keine	keine	keine
Rez. 3	keine	keine	keine	keine
Rez. 4	keine	keine	keine	keine

Beispiel 5:

Wie in Beispiel 3 beschrieben wurden Lösungen von G-CSF mit verschiedenen Puffersystemen und jeweils 0,005 % (in Abb. 2 und 3 0,05 %) Polysorbat 80 hergestellt. Für jedes untersuchte Puffersystem wurden verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zwischen 2 - 7,5 in Abständen von 0,5 pH-Einheiten hergestellt (somit pro Puffersystem 13 Lösungen). Nach den oben beschriebenen Methoden (Beispiel 3) wurde die mechanische Belastbarkeit der Lösungen mittels Streulichtmessung untersucht. Folgende Puffersysteme wurden untersucht (Gehalt an G-CSF und übrigen Hilfsstoffen wie in Beispiel 3):

- 5.1 Acetat 10 mMol/l
- 5.2 Acetat 20 mMol/l
- 5.3 Acetat 40 mMol/l
- 5.4 Phosphat 20 mMol/l
- 5.5 Phosphat/Citrat insgesamt 20 mMol/l, mit 10 mMol/l Phosphat
- 5.6 Lactat 10 mMol/l
- 5.7 Maleat 10 mMol/l
- 5.8 Citrat 20 mMol/l

In Abhängigkeit des pH-Wertes der Lösung erfolgte die Messung des Streulichts nach erfolgter mechanischer Belastung. Die Ergebnisse sind den Abb. 1 - 4 zu entnehmen. Für jedes Puffersystem ist dort ein individueller Verlauf der pH-Trübungskurve angegeben. Citrat ist insbesondere im pH-Bereich von 4 - 6,5 ungeeignet; Citrat/Phosphatpuffer im pH-Bereich von 4,5 - 6,5 unge-

eignet; Acetat im pH-Bereich von etwa 5 - 7 ungeeignet und Phosphat im pH-Bereich von etwa 5 - 6,75 ungeeignet. Lactat verhält sich wie Acetat, Maleat wie Citrat/Phosphat.

Beispiel 6:

Untersuchungen zur mechanischen Stabilität von G-CSF-Lösungen einer Konzentration von 0,35 mg/ml mit 0,5 mg/ml Tween 80 in Abhängigkeit von Pufferkonzentration und pH-Wert

G-CSF-Lösungen einer Konzentration von ca. 5 mg/ml wurden mit nachfolgend beschriebenen Pufferlösungen auf einen Wirkstoffgehalt von 0,35 mg/ml verdünnt. Alle Pufferlösungen enthielten 0,05 % Polysorbat 80. Die Pufferlösungen wurden hergestellt, indem die jeweilige basische Salzkomponente in der angegebenen molaren Konzentration vorgelegt und mit der korrespondierenden Säure der pH-Wert auf den angegebenen Wert eingestellt wurde. Die so erhaltenen G-CSF-Pufferlösungen wurden in einer Menge von 10 ml in Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse 1 eingefüllt, mit einem geeigneten Stopfen verschlossen und 10 Sekunden bei maximaler Intensität auf einem Laborschüttler (z. B. Fa. Heidolph) geschüttelt. Nach einer Standzeit von ca. 10 Minuten wurde mit einem Streulichtphotometer (Meßwinkel 90 °C) der Firma Dr. Lange, Streulichtphotometer LTP 5 ein gegen Formazinstandard (Deutsches Arzneibuch) kalibrierter Trübungswert ermittelt (TE/F).

Tabelle 3a: Trübung der Lösung ungeschüttelt

	Acetat Puffer	Phosphat Puffer	Citrat Puffer
	TE/F	TE/F	TE/F
pH 7,5	0,56	0,58	0,51
pH 7	0,47	0,51	0,43
80 mmol pH 5	0,55	0,47	0,48
pH 4,5	0,36	0,47	0,46
pH 4	0,39	0,46	0,41
pH 3,5	0,3	0,54	0,41

	Acetat Puffer	Phosphat Puffer	Citrat Puffer
	TE/F	TE/F	TE/F
40 mmol pH 5	pH 7,5 0,57	0,4	0,45
	pH 7 0,51	0,37	0,39
	0,62	0,4	0,48
	pH 4,5 0,42	0,58	0,52
	pH 4 0,44	0,41	0,55
	pH 3,5 0,42	0,43	0,37
20 mmol pH 5	pH 7,5 0,65	0,39	0,4
	pH 7 0,8	0,46	0,4
	0,62	0,49	0,39
	pH 4,5 0,47	0,42	0,39
	pH 4 0,44	0,43	0,47
	pH 3,5 0,49	0,37	0,38
10 mmol pH 5	pH 7,5 0,54	0,43	0,55
	pH 7 0,68	0,38	0,49
	0,42	0,41	0,55
	pH 4,5 0,37	0,45	0,43
	pH 4 0,35	0,36	0,44
	pH 3,5 0,4	0,43	0,42
5 mmol pH 5	pH 7,5 0,83	0,57	0,35
	pH 7 0,63	0,37	0,37
	0,65	0,41	0,42
	pH 4,5 0,42	0,4	0,31
	pH 4 0,4	0,4	0,64
	pH 3,5 0,38	0,48	0,44

Tabelle 3b: Trübung der Lösung geschüttelt

	Acetat Puffer	Phosphat Puffer	Citrat Puffer
	TE/F	TE/F	TE/F
80 mmol pH 5	pH 7,5	1,49	0,74
	pH 7	1,94	0,77
	pH 4,5	0,73	0,75
	pH 4	0,42	0,68
	pH 4	0,45	0,57
	pH 3,5	0,32	0,66
40 mmol pH 5	pH 7,5	1,52	0,7
	pH 7	1,24	0,58
	pH 4,5	0,8	0,6
	pH 4	0,5	0,64
	pH 4	0,63	0,62
	pH 3,5	0,55	0,64
20 mmol pH 5	pH 7,5	2,2	0,45
	pH 7	2,9	0,6
	pH 4,5	0,7	0,77
	pH 4	0,55	0,48
	pH 4	0,56	0,5
	pH 3,5	0,43	0,4
10 mmol pH 5	pH 7,5	1,22	0,59
	pH 7	1,4	0,46
	pH 4,5	0,47	0,51
	pH 4	0,43	0,45
	pH 4	0,47	0,38
	pH 3,5	0,44	0,51
5 mmol pH 5	pH 7,5	2	0,76
	pH 7	1,4	0,6
	pH 4,5	0,47	0,51
	pH 4	0,43	0,44
	pH 4	0,47	0,44
	pH 3,5	0,44	0,5

Aus den Daten geht hervor, daß Phosphatpuffer im untersuchten pH-Bereich über die gesamte Molarität von 5 - 80 mMol/l niedrige Trübungswerte zeigen, die unter mechanischer Belastung geringfügig ansteigen.

Acetatpuffer zeigen im pH-Bereich von 3,5 - 4,5 auch unter mechanischem Streß sehr geringe Trübungswerte.

Citratpuffer sind geeignet, im pH-Bereich von 7 - 7,5 in Konzentrationen von 5 - 40 mMol/l zu stabilisieren.

Beispiel 7:

Es werden flüssige Rezepturen im pH-Bereich von 7,0 - 7,5 beschrieben, denen zum Teil neben isotonisierenden Zusätzen auch weitere Hilfsstoffe aus der Gruppe der Antioxidationen und chaotrope Hilfsstoffe zugesetzt werden.

Zur Herstellung der nachfolgend genannten Rezepturen wurden die entsprechenden Hilfsstoffe in Wasser für Injektionszwecke gelöst, G-CSF wurde zugefügt und gegebenenfalls der pH-Wert durch geringe Mengen der entsprechenden Pufferkomponenten genau eingestellt. Die Lösungen wurden durch einen sterilisierten Membranfilter mit der Porenweite von 0,2 µm sterilfiltriert und unter aseptischen Bedingungen in sterile Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse I gefüllt und mit sterilen, teflonisierten Gummistöpfen verschlossen. Die Abfüllung fand unter Stickstoffbegasung statt. Die verbördelten Injektionsflaschen wurden unter Lichtauschluß bei definierten Lagertemperaturen bis zur Untersuchung gelagert. Untersucht wurde mit den in den Beispielen 2 und 3 beschriebenen Methoden.

Tabelle 4a: Flüssige G-CSF Zubereitung; pH 7

	Rezeptur 5	Rezeptur 6	Rezeptur 7
G-CSF	0,35 mg	0,35 mg	0,35 mg
Polysorbat	0,1 mg	0,1 mg	0,1 mg
Mannit	40 mg	40 mg	40 mg
Puffer	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1,5 mg	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1,5 mg	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1,5 mg
Glutathion	-	0,5 mg	-
Harnstoff	-	-	5 mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 1 ml	ad 1 ml	ad ml

Tabelle 4b: Analysendaten zu Flüssigrezepturen zu G-CSF bei pH 7

	Lagerung 4 Wochen bei 4 - 8 °C		
	I	II	III
Rez. 5	> 99 %	> 99 %	2,7 %
Rez. 6	99 %	> 99 %	4,8 %
Rez. 7	> 99 %	> 99 %	0,6 %

- I Reinheit unverändertes Protein in RP HPLC
- II Reinheit unverändertes Protein in SEC HPLC
- III Dimeren/Aggregate in Western Blot

Die Analysendaten aus Tabelle 4b zeigen, daß stabile Lösungen bei pH 7 und der angegebenen Phosphatpufferkonzentration erhalten werden und die Reinheit des Proteins nach vier Wochen Lagerung weitgehend unverändert (> 99 %) beibehalten wird.

Beispiel 8:

Es werden Lösungen von G-CSF hergestellt, wobei eine Lösung Phosphatpuffer enthält und einen erfindungsgemäßen pH-Wert von 4,5 besitzt (Rezeptur 8). Zu Vergleichszwecken wird eine zweite Lösung hergestellt, die einen pH-Wert von 6,5 aufweist (Rezeptur 9).

Zur Herstellung der Arzneistofflösungen wurden die Hilfsstoffe in Wasser für Injektionszwecke gelöst, dann wurde GCSF zugefügt. Die Lösungen wurden durch einen sterilen 0,2 μ m Membranfilter sterilfiltriert, in Vials der hydroskopischen Klasse I abgefüllt und diese mit einem Teflonstopfen verschlossen. Danach wurde 10 Min. mit einem Laborschüttler (Fa. Heidolph) behandelt. Untersucht wurde die Lösung mit den in den Beispielen 2 und 3 beschriebenen Methoden.

Tabelle 5a: Zusammensetzung der Rezepturen

	Rezeptur 8	Rezeptur 9
G-CSF	0,350 mg	0,250 mg
Tween 80	0,1 mg	-
Tween 20	-	0,1 mg
Humanserum- albumin	-	1 mg
Mannit	50 mg	50 mg
Phosphatpuffer	5 mMol/l	5 mMol/l
pH	4,5	6,5
Wasser für Injektionszwecke	ad 1,0 ml	ad 1,0 ml

Tabelle 5b: Analytische Ergebnisse (Western Blot)

	Rezeptur 5	Rezeptur 6
ohne mechanische Belastung	0,8 % Dimere keine Aggregate	1,1 % Dimere keine Aggregate
nach mechanischer Belastung	1,1 % Dimere keine Aggregate	2,7 % Dimere 6,9 % Aggregate

Aus den in der Tabelle angegebenen Ergebnissen ist ersichtlich, daß auch der Zusatz von Human-Serum-Albumin die durch mechanische Belastung hervorgerufene Aggregation und Dimerisierung des Proteins bei pH 6,5 nicht verhindern kann. Bei einem pH-Wert von 4,5 hingegen wird eine gegenüber mechanischer Belastung stabile Lösung erhalten, auch wenn kein Humanserumalbumin als Stabilisierungsmittel vorhanden ist.

Beispiel 9:**Langzeitstabilität**

Eine G-CSF-Injektionslösung wurde hergestellt, indem man 0,35 mg/ml G-CSF in einer Lösung von 50 mg/ml Manitol, 0,1 mg/ml Polysorbat 80 und 0,5 mg Phosphorsäure, eingestellt auf pH 4,5 mit Natriumhydrogenphosphat unter Rühren löst. Herstellung und Abfüllung der Lösung erfolgte unter Stickstoffbegasung. Die klare Lösung wurde durch Filtration mittels sterilisierter Membranfilter mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert, anschließend in Injektionsflaschen der hydrolytischen Klasse 1 abgefüllt und mit geeigneten Gummistopfen verschlossen. Die G-CSF-haltigen Arzneizubereitungen wurden bei Temperaturen von + 4 bis + 8 sowie + 20 bis + 25 °C über 9 Monate gelagert.

Tabelle 6: Langzeitstabilität bei 4 - 8 °C

	3 Monate	6 Monate	9 Monate
biol. Aktivität 80 % - 125 %	entspr.	entspr.	entspr.
Western Blot % Aggr.	n.n.	n.n.	n.n.
% Dimere	< 1 %	< 1 %	< 1 %
SDS Page % Nebenpeaks	< 1 %	< 1 %	< 1 %
RP-HPLC Produktpeak	> 99 %	> 99 %	> 99 %
SEC HPLC Prod. peak	> 98 %	> 98 %	> 98 %
Nebenpeaks	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Trübung TEF	0,7	0,7	0,7
OD 280	0,359	0,362	0,357

Beispiel 10:

G-CSF-Lösungen einer Konzentration von ca. 5 mg/ml wurden mit nachfolgend beschriebenen Pufferlösungen auf einen Wirkstoffgehalt von 0,35 mg/ml verdünnt. Alle Pufferlösungen enthielten 0,05 % Polysorbat 80. Die Pufferlösungen wurden hergestellt, indem Arginin in der angegebenen molaren Menge zwischen 5 - 80 mMol/l vorgelegt und mit Phosphorsäure oder Salzsäure oder Citronensäure der pH-Wert eingestellt wurde. Die so erhaltenen G-CSF-Pufferlösungen wurden in einer Menge von 10 ml in Injektionsflaschen aus Glas der hydrolytischen Klasse 1 eingefüllt, mit einem geeigneten Stopfen verschlossen und 10 Sekunden bei maximaler Intensität auf einem Laborschüttler (z. B. Fa. Heidolph) geschüttelt. Nach einer Standzeit von ca. 10 Minuten wurde mit einem Streulichtphotometer (Meßwinkel 90 °C) der Firma Dr. Lange, Streulichtphotometer LTP 5 ein gegen Formazinstandard (Deutsches Arzneibuch) kalibrierter Trübungswert ermittelt (TE/F).

In Tabelle 7 sind die Trübungsmittelwerte der ungeschüttelten und geschüttelten Lösungen dargestellt. Die verschiedenen molaren Konzentrationen (5, 10, 20, 40, 80 mMol) an Argininpuffersystemen führen zu jeweils gleichen Ergebnissen.

Es ist festzustellen, daß Argininpuffer im pH-Bereich von 7,0 - 7,5 ganz besonders gut stabilisierend gegen mechanischen Stress wirkt. Argininpuffer können besonders vorteilhaft in Lösungen eingesetzt werden, die durch Auflösen von Lyophilisaten hergestellt werden.

Tabelle 7: Trübungswerte mit Argininpuffer

Puffer	Arginin/ Phosphorsäure	Arginin/ Salzsäure	Arginin/ Citronensäure
pH 7,5	0,40	0,42	0,51
pH 7,0	0,43	0,54	0,76
ungeschüttelt			
pH 7,5	0,49	0,62	0,53
pH 7,0	0,58	0,69	0,84
geschüttelt			

Mittelwerte Molarität 5 - 80 mMol/l

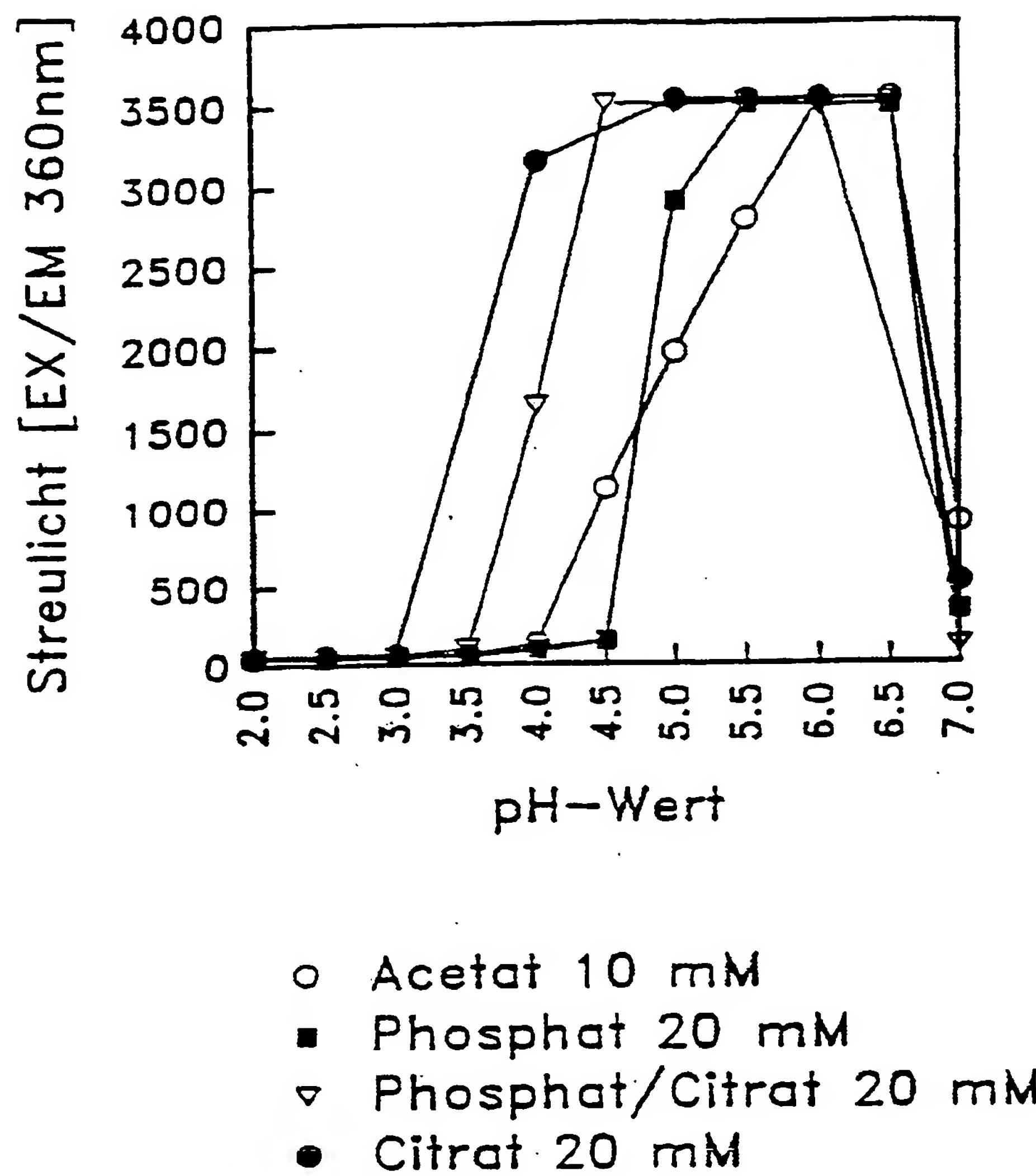
Patentansprüche

1. Stabile, wässrige pharmazeutische Zubereitung enthaltend G-CSF in einer therapeutisch wirksamen Menge und mindestens eine Puffersubstanz ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salze oder Arginin und seiner Salze, wobei die Endkonzentration der Puffersubstanz in der fertig applizierbaren Lösung von 2 bis 100 mMol/l beträgt.
2. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Phosphat 5 - 80 mMol/l beträgt und der pH-Wert der fertig applizierbaren Lösung auf Werte zwischen etwa 3,5 - 5 oder 7 - 8 eingestellt ist.
3. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Citrat oder die Konzentration von Maleat 5 - 40 mMol/l beträgt und der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen etwa 2,5 - 3,5 oder 7 - 8 eingestellt ist.
4. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtkonzentration von Phosphat und Citrat als Puffersubstanzen 5 - 40 mMol/l beträgt und der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen etwa 2,5 - 3,5 oder 7 - 8 eingestellt ist.
5. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Acetat oder die Konzentration Lactat 5 - 80 mMol/l beträgt und der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen etwa 3,5 - 5 eingestellt ist.
6. Zubereitung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration von Argininphosphat-, Argininchlorid- oder Arginincitratpuffer 5 - 80 mMol/l beträgt und der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen etwa 7 - 8, vorzugsweise 7 - 7,5, eingestellt ist.
7. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung eine Tensidmenge enthält, die kleiner oder maximal gleich der eingesetzten Menge an G-CSF ist.

8. Zubereitung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung eine Tensidmenge enthält, die maximal 0,5 mg/ml, vorzugsweise 0,01 - 0,1 mg/ml, beträgt.
9. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung zusätzlich übliche pharmazeutische Hilfsstoffe oder isotonisierende Mittel enthält.
10. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung frei von polymeren oder proteinartigen Hilfsstoffen ist.
11. Verfahren zur Herstellung einer stabilen wässrigen pharmazeutischen Zubereitung enthaltend G-CSF, dadurch gekennzeichnet, daß man eine pharmazeutisch wirksame Menge von G-CSF mit mindestens einer Puffersubstanz ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salze oder Arginin und seiner Salze versetzt, und die Menge der Puffersubstanz derart wählt, daß die Endkonzentration der Puffersubstanz in der fertig applizierbaren Lösung von 2 bis zu 100 mMol/l beträgt.
12. Verfahren zur Stabilisierung einer wässrigen pharmazeutischen Zubereitung enthaltend G-CSF, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Puffersubstanz ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salze oder Arginin und seiner Salze in einer Endkonzentration von 2 bis zu 100 mMol/l in der fertig applizierbaren Lösung als Stabilisierungsmittel zur Vermeidung von Trübungen einsetzt.
13. Verwendung von Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure und deren Salzen oder Arginin und seiner Salze zur Vermeidung von Trübungen im Fall von wässrigen pharmazeutischen G-CSF-haltigen Zubereitungen.
14. Lyophilisat oder Pulver, hergestellt aus einer Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 10.

15. Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1 - 10, hergestellt durch Auflösen von Lyophilisten oder Pulvern gemäß Anspruch 13 in Wasser oder wäßrigen Lösungen.

1/3



2/3

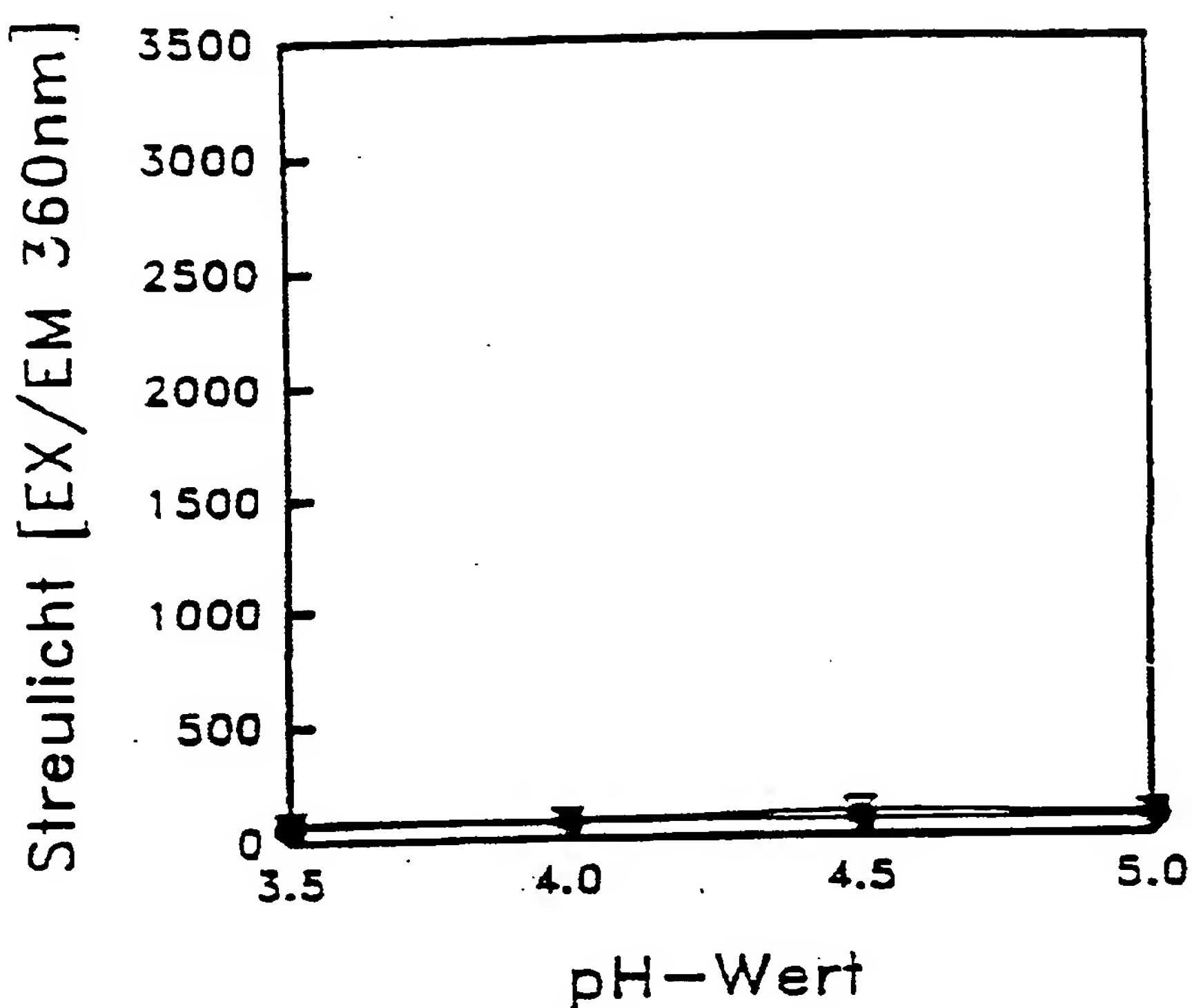
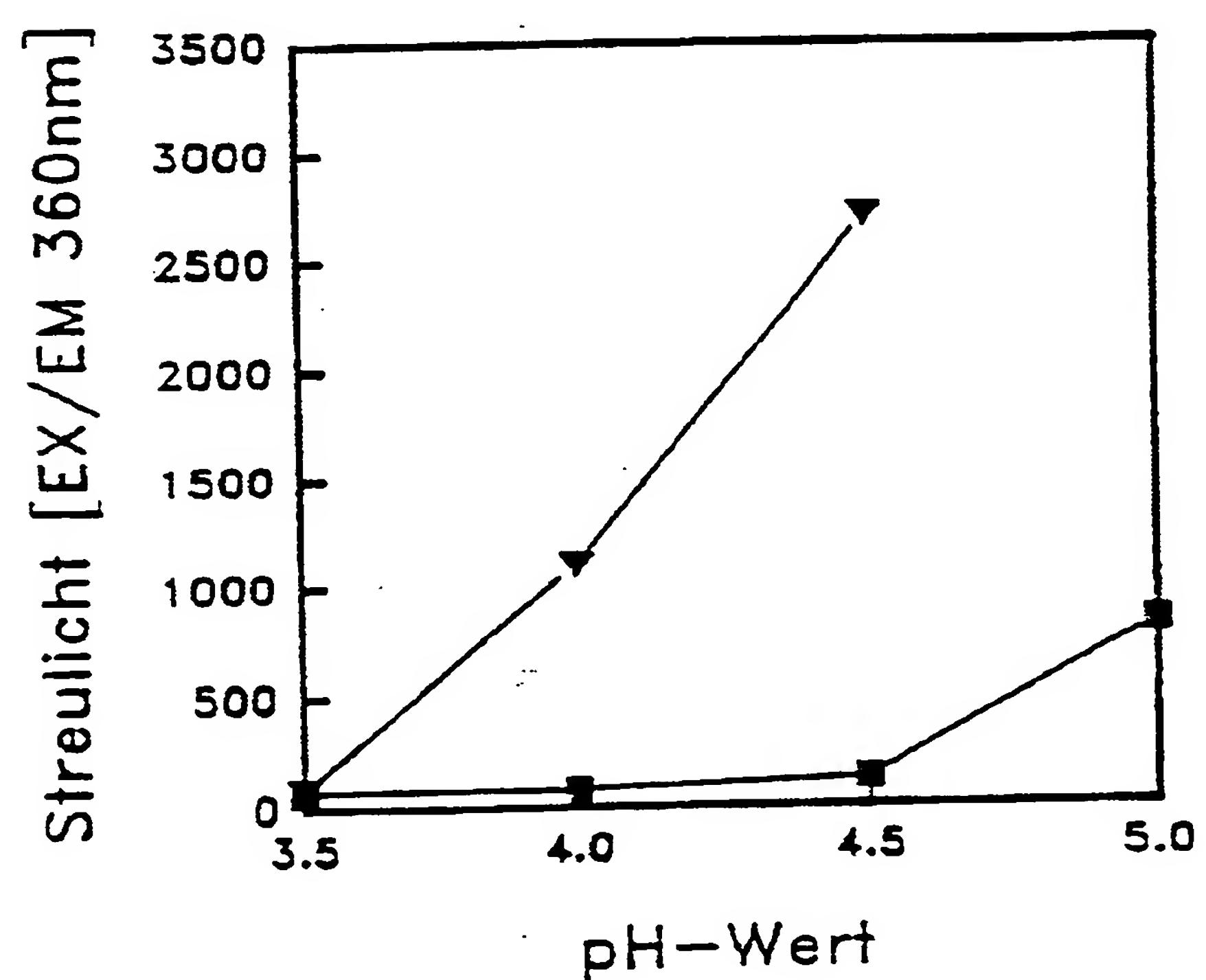


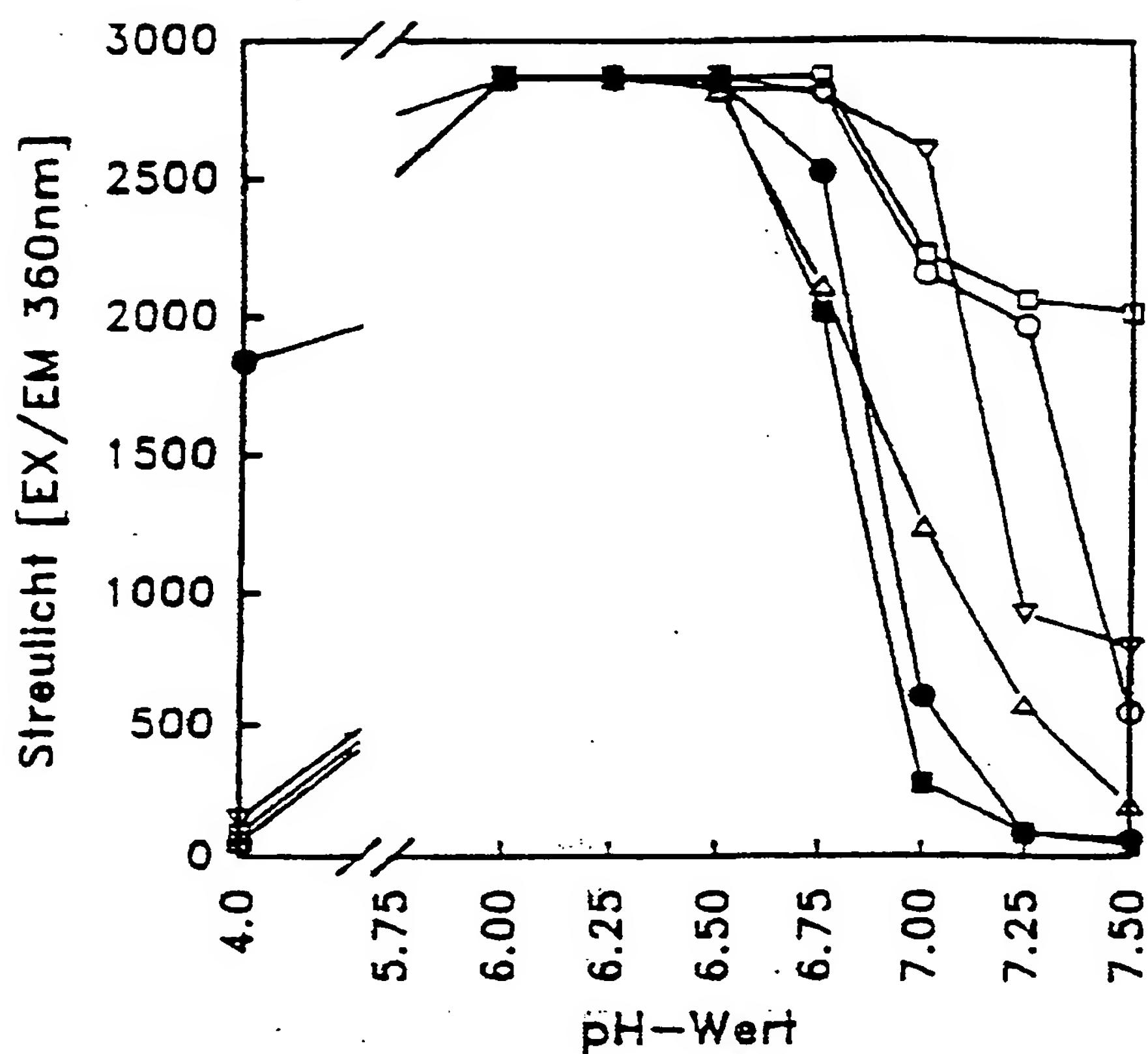
Abbildung 3



■ NaPhosphat/Citrat
▼ Citrat

▽ NaAcetat
● NaPhosphat

Abbildung 4



- HAc 10 mM
- ▽ HAc 20 mM
- △ HAc 40 mM
- NaAc 20 mM
- Citrat/Phosphat 20 mM
- Phosphat 20 mM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 93/03544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K37/02 A61K9/14 A61K47/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 289 (C-0956) 26 June 1992 & JP,A,04 077 434 (KANJI TANAKA) 11 March 1992 see abstract --- DE,A,37 23 781 (CHUGAI SEIYAKU K.K.) 21 January 1988 cited in the application see claims see examples ---	1,7,10, 13
A	EP,A,0 373 679 (AMGEN INC.) 20 June 1990 cited in the application see claims see page 4, line 21 see page 4, line 38 ---	1-15
A	--- -/-	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 1994

Date of mailing of the international search report

16.03.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentdaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarpioni, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.

PCT/EP 93/03544

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 306 824 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 March 1989 cited in the application see claims see page 2, line 6 see page 2, line 55 see page 3, line 4 - line 8 -----	1-15
P,X	EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,3,11 see page 4, line 32 - line 33 see page 4, line 43 see page 5, line 12 - line 21 see page 5, line 44 - line 45 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Appl. No.

PCT/EP 93/03544

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B-	611856	27-06-91
		AU-A-	7566587	21-01-88
		BE-A-	1000253	27-09-88
		CH-A-	671157	15-08-89
		FR-A-	2601591	22-01-88
		GB-A, B	2193631	17-02-88
		JP-A-	63146826	18-06-88
		NL-A-	8701640	16-02-88
		SE-A-	8702907	19-01-88
		JP-A-	63146827	18-06-88
		JP-A-	63152326	24-06-88
		JP-A-	63146828	18-06-88
EP-A-0373679	20-06-90	US-A-	5104651	14-04-92
		AU-B-	621695	19-03-92
		AU-A-	4668989	10-07-90
		CA-A-	2005143	16-06-90
		JP-T-	3502808	27-06-91
		WO-A-	9006762	28-06-90
EP-A-0306824	15-03-89	DE-A-	3729863	16-03-89
		AU-A-	2173988	27-04-89
		DE-A-	3872334	30-07-92
		JP-A-	1071818	16-03-89
		US-A-	4992419	12-02-91
EP-A-0528314	24-02-93	DE-A-	4126984	18-02-93
		AU-A-	2405292	16-03-93
		WO-A-	9303745	04-03-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ₁ ₂ ₃ ₄ ₅ ₆ ₇ ₈ ₉ ₁₀ ₁₁ ₁₂ ₁₃ ₁₄ ₁₅ ₁₆ ₁₇ ₁₈ ₁₉ ₂₀ ₂₁ ₂₂ ₂₃ ₂₄ ₂₅ ₂₆ ₂₇ ₂₈ ₂₉ ₃₀ ₃₁ ₃₂ ₃₃ ₃₄ ₃₅ ₃₆ ₃₇ ₃₈ ₃₉ ₄₀ ₄₁ ₄₂ ₄₃ ₄₄ ₄₅ ₄₆ ₄₇ ₄₈ ₄₉ ₅₀ ₅₁ ₅₂ ₅₃ ₅₄ ₅₅ ₅₆ ₅₇ ₅₈ ₅₉ ₆₀ ₆₁ ₆₂ ₆₃ ₆₄ ₆₅ ₆₆ ₆₇ ₆₈ ₆₉ ₇₀ ₇₁ ₇₂ ₇₃ ₇₄ ₇₅ ₇₆ ₇₇ ₇₈ ₇₉ ₈₀ ₈₁ ₈₂ ₈₃ ₈₄ ₈₅ ₈₆ ₈₇ ₈₈ ₈₉ ₉₀ ₉₁ ₉₂ ₉₃ ₉₄ ₉₅ ₉₆ ₉₇ ₉₈ ₉₉ ₁₀₀ ₁₀₁ ₁₀₂ ₁₀₃ ₁₀₄ ₁₀₅ ₁₀₆ ₁₀₇ ₁₀₈ ₁₀₉ ₁₁₀ ₁₁₁ ₁₁₂ ₁₁₃ ₁₁₄ ₁₁₅ ₁₁₆ ₁₁₇ ₁₁₈ ₁₁₉ ₁₂₀ ₁₂₁ ₁₂₂ ₁₂₃ ₁₂₄ ₁₂₅ ₁₂₆ ₁₂₇ ₁₂₈ ₁₂₉ ₁₃₀ ₁₃₁ ₁₃₂ ₁₃₃ ₁₃₄ ₁₃₅ ₁₃₆ ₁₃₇ ₁₃₈ ₁₃₉ ₁₄₀ ₁₄₁ ₁₄₂ ₁₄₃ ₁₄₄ ₁₄₅ ₁₄₆ ₁₄₇ ₁₄₈ ₁₄₉ ₁₅₀ ₁₅₁ ₁₅₂ ₁₅₃ ₁₅₄ ₁₅₅ ₁₅₆ ₁₅₇ ₁₅₈ ₁₅₉ ₁₆₀ ₁₆₁ ₁₆₂ ₁₆₃ ₁₆₄ ₁₆₅ ₁₆₆ ₁₆₇ ₁₆₈ ₁₆₉ ₁₇₀ ₁₇₁ ₁₇₂ ₁₇₃ ₁₇₄ ₁₇₅ ₁₇₆ ₁₇₇ ₁₇₈ ₁₇₉ ₁₈₀ ₁₈₁ ₁₈₂ ₁₈₃ ₁₈₄ ₁₈₅ ₁₈₆ ₁₈₇ ₁₈₈ ₁₈₉ ₁₉₀ ₁₉₁ ₁₉₂ ₁₉₃ ₁₉₄ ₁₉₅ ₁₉₆ ₁₉₇ ₁₉₈ ₁₉₉ ₂₀₀ ₂₀₁ ₂₀₂ ₂₀₃ ₂₀₄ ₂₀₅ ₂₀₆ ₂₀₇ ₂₀₈ ₂₀₉ ₂₁₀ ₂₁₁ ₂₁₂ ₂₁₃ ₂₁₄ ₂₁₅ ₂₁₆ ₂₁₇ ₂₁₈ ₂₁₉ ₂₂₀ ₂₂₁ ₂₂₂ ₂₂₃ ₂₂₄ ₂₂₅ ₂₂₆ ₂₂₇ ₂₂₈ ₂₂₉ ₂₃₀ ₂₃₁ ₂₃₂ ₂₃₃ ₂₃₄ ₂₃₅ ₂₃₆ ₂₃₇ ₂₃₈ ₂₃₉ ₂₄₀ ₂₄₁ ₂₄₂ ₂₄₃ ₂₄₄ ₂₄₅ ₂₄₆ ₂₄₇ ₂₄₈ ₂₄₉ ₂₅₀ ₂₅₁ ₂₅₂ ₂₅₃ ₂₅₄ ₂₅₅ ₂₅₆ ₂₅₇ ₂₅₈ ₂₅₉ ₂₆₀ ₂₆₁ ₂₆₂ ₂₆₃ ₂₆₄ ₂₆₅ ₂₆₆ ₂₆₇ ₂₆₈ ₂₆₉ ₂₇₀ ₂₇₁ ₂₇₂ ₂₇₃ ₂₇₄ ₂₇₅ ₂₇₆ ₂₇₇ ₂₇₈ ₂₇₉ ₂₈₀ ₂₈₁ ₂₈₂ ₂₈₃ ₂₈₄ ₂₈₅ ₂₈₆ ₂₈₇ ₂₈₈ ₂₈₉ ₂₉₀ ₂₉₁ ₂₉₂ ₂₉₃ ₂₉₄ ₂₉₅ ₂₉₆ ₂₉₇ ₂₉₈ ₂₉₉ ₃₀₀ ₃₀₁ ₃₀₂ ₃₀₃ ₃₀₄ ₃₀₅ ₃₀₆ ₃₀₇ ₃₀₈ ₃₀₉ ₃₁₀ ₃₁₁ ₃₁₂ ₃₁₃ ₃₁₄ ₃₁₅ ₃₁₆ ₃₁₇ ₃₁₈ ₃₁₉ ₃₂₀ ₃₂₁ ₃₂₂ ₃₂₃ ₃₂₄ ₃₂₅ ₃₂₆ ₃₂₇ ₃₂₈ ₃₂₉ ₃₃₀ ₃₃₁ ₃₃₂ ₃₃₃ ₃₃₄ ₃₃₅ ₃₃₆ ₃₃₇ ₃₃₈ ₃₃₉ ₃₄₀ ₃₄₁ ₃₄₂ ₃₄₃ ₃₄₄ ₃₄₅ ₃₄₆ ₃₄₇ ₃₄₈ ₃₄₉ ₃₅₀ ₃₅₁ ₃₅₂ ₃₅₃ ₃₅₄ ₃₅₅ ₃₅₆ ₃₅₇ ₃₅₈ ₃₅₉ ₃₆₀ ₃₆₁ ₃₆₂ ₃₆₃ ₃₆₄ ₃₆₅ ₃₆₆ ₃₆₇ ₃₆₈ ₃₆₉ ₃₇₀ ₃₇₁ ₃₇₂ ₃₇₃ ₃₇₄ ₃₇₅ ₃₇₆ ₃₇₇ ₃₇₈ ₃₇₉ ₃₈₀ ₃₈₁ ₃₈₂ ₃₈₃ ₃₈₄ ₃₈₅ ₃₈₆ ₃₈₇ ₃₈₈ ₃₈₉ ₃₉₀ ₃₉₁ ₃₉₂ ₃₉₃ ₃₉₄ ₃₉₅ ₃₉₆ ₃₉₇ ₃₉₈ ₃₉₉ ₄₀₀ ₄₀₁ ₄₀₂ ₄₀₃ ₄₀₄ ₄₀₅ ₄₀₆ ₄₀₇ ₄₀₈ ₄₀₉ ₄₁₀ ₄₁₁ ₄₁₂ ₄₁₃ ₄₁₄ ₄₁₅ ₄₁₆ ₄₁₇ ₄₁₈ ₄₁₉ ₄₂₀ ₄₂₁ ₄₂₂ ₄₂₃ ₄₂₄ ₄₂₅ ₄₂₆ ₄₂₇ ₄₂₈ ₄₂₉ ₄₃₀ ₄₃₁ ₄₃₂ ₄₃₃ ₄₃₄ ₄₃₅ ₄₃₆ ₄₃₇ ₄₃₈ ₄₃₉ ₄₄₀ ₄₄₁ ₄₄₂ ₄₄₃ ₄₄₄ ₄₄₅ ₄₄₆ ₄₄₇ ₄₄₈ ₄₄₉ ₄₅₀ ₄₅₁ ₄₅₂ ₄₅₃ ₄₅₄ ₄₅₅ ₄₅₆ ₄₅₇ ₄₅₈ ₄₅₉ ₄₆₀ ₄₆₁ ₄₆₂ ₄₆₃ ₄₆₄ ₄₆₅ ₄₆₆ ₄₆₇ ₄₆₈ ₄₆₉ ₄₇₀ ₄₇₁ ₄₇₂ ₄₇₃ ₄₇₄ ₄₇₅ ₄₇₆ ₄₇₇ ₄₇₈ ₄₇₉ ₄₈₀ ₄₈₁ ₄₈₂ ₄₈₃ ₄₈₄ ₄₈₅ ₄₈₆ ₄₈₇ ₄₈₈ ₄₈₉ ₄₉₀ ₄₉₁ ₄₉₂ ₄₉₃ ₄₉₄ ₄₉₅ ₄₉₆ ₄₉₇ ₄₉₈ ₄₉₉ ₅₀₀ ₅₀₁ ₅₀₂ ₅₀₃ ₅₀₄ ₅₀₅ ₅₀₆ ₅₀₇ ₅₀₈ ₅₀₉ ₅₁₀ ₅₁₁ ₅₁₂ ₅₁₃ ₅₁₄ ₅₁₅ ₅₁₆ ₅₁₇ ₅₁₈ ₅₁₉ ₅₂₀ ₅₂₁ ₅₂

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/03544

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 306 824 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15. März 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche siehe Seite 2, Zeile 6 siehe Seite 2, Zeile 55 siehe Seite 3, Zeile 4 - Zeile 8 ---	1-15
P,X	EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,3,11 siehe Seite 4, Zeile 32 - Zeile 33 siehe Seite 4, Zeile 43 siehe Seite 5, Zeile 12 - Zeile 21 siehe Seite 5, Zeile 44 - Zeile 45 ---	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Aktenzeichen

PCT/EP 93/03544

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B-	611856	27-06-91
		AU-A-	7566587	21-01-88
		BE-A-	1000253	27-09-88
		CH-A-	671157	15-08-89
		FR-A-	2601591	22-01-88
		GB-A, B	2193631	17-02-88
		JP-A-	63146826	18-06-88
		NL-A-	8701640	16-02-88
		SE-A-	8702907	19-01-88
		JP-A-	63146827	18-06-88
		JP-A-	63152326	24-06-88
		JP-A-	63146828	18-06-88
EP-A-0373679	20-06-90	US-A-	5104651	14-04-92
		AU-B-	621695	19-03-92
		AU-A-	4668989	10-07-90
		CA-A-	2005143	16-06-90
		JP-T-	3502808	27-06-91
		WO-A-	9006762	28-06-90
EP-A-0306824	15-03-89	DE-A-	3729863	16-03-89
		AU-A-	2173988	27-04-89
		DE-A-	3872334	30-07-92
		JP-A-	1071818	16-03-89
		US-A-	4992419	12-02-91
EP-A-0528314	24-02-93	DE-A-	4126984	18-02-93
		AU-A-	2405292	16-03-93
		WO-A-	9303745	04-03-93

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.